

„ β 2-Microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells“

-

Mäuse mit einem Knock-out bezüglich β -Microglobulin sind nicht in der Lage CD4-8⁺ cytotoxische T-Zellen zu bilden

Nature, Vol 344, 19. April 1990

Maarten Zijlstra, Mark Bix, Neil E. Simister, Janet M. Loring,
David H. Raulet & Rudolf Jaenisch

Homozygot Mutante Mäuse

- Mäuse die heterozygot bezüglich der Mutation des $\beta 2$ -Microglobulin Gens sind werden untereinander verpaart (Intercross)
=>Züchtung homozygot mutanter Mäuse
- Diese Mäuse zeigen keinerlei phänotypische Auffälligkeiten, züchten normal, scheinen völlig gesund zu sein und sind damit äußerlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden
- Nachweis der tatsächlichen Homozygotie:
DNA Isolierung aus Mausembryonen (14- 18 d nach Gastrulation), frisch entwöhnten Mäusen und den Elterntieren
=>Ermittlung der Genotypen mittels **Southern Blot**

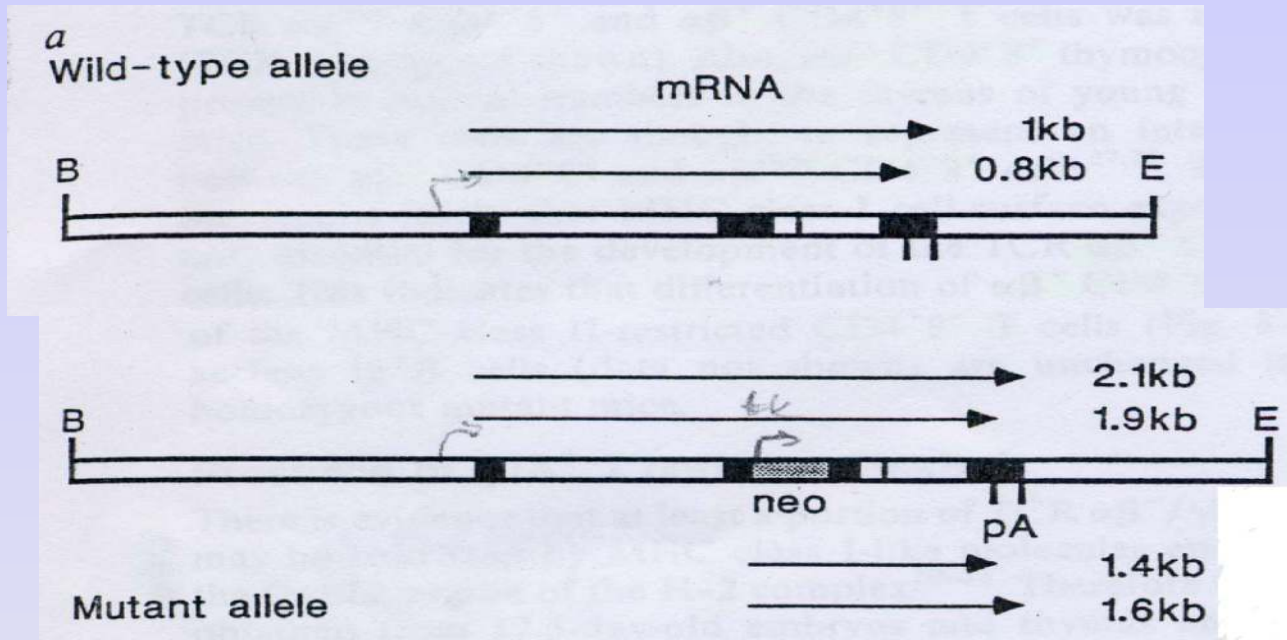
Ergebnisse des Southern Blot

TABLE 1 Transmission of mutant $\beta 2$ -m gene

Parents	No. of Litters (age)	Genotype of progeny (no.)		
		-/-	+/-	+/+
+/- \times +/-	4 (embryonic)	9	17	7
	21 (postnatal)	23	52	26
-/- \times -/-	2 (postnatal)	17	0	0

- 9 von 33 Embryonen waren homozygot
- 23 von 101 gerade entwöhnten Tieren waren homozygot
- Bei der Kreuzung von zwei homozygoten Eltern
alle Nachkommen sind homozygot mutant
=> Erbgang folgt den Mendelschen Gesetzen

Transkription der beiden Gene

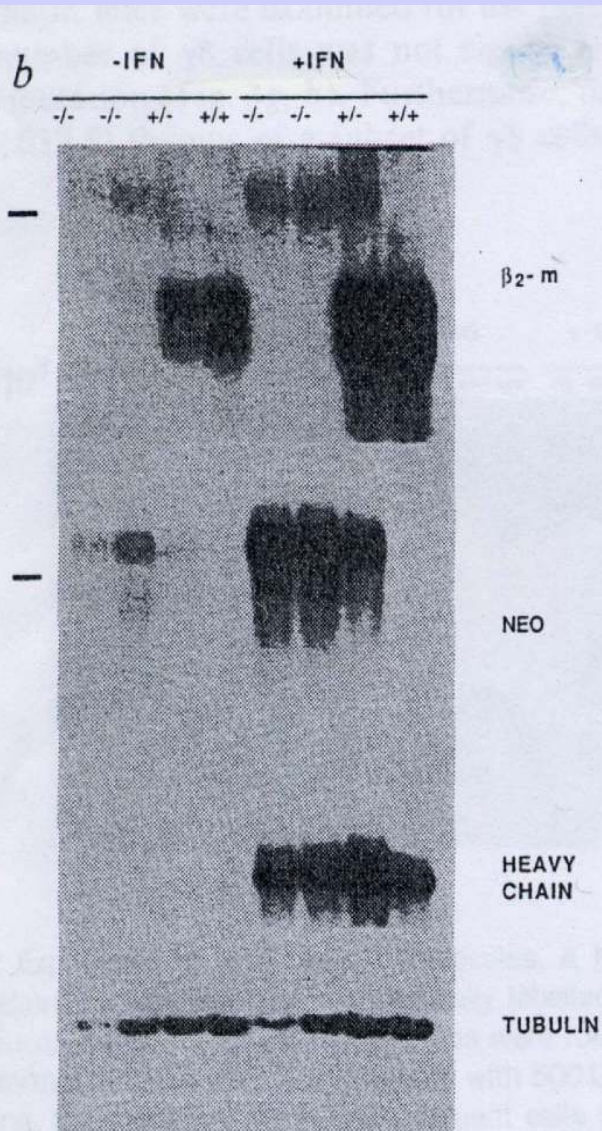


- Das mutante (defekte) Gen ist durch die Insertion eines Neomycin-Gens charakterisiert, welches der Kontrolle eines eigenen Promotors (tk Promotor des HSV) unterliegt
- => diese Insertion bewirkt eine Zerstörung des Leserahmens, das β 2-Microglobulin Gen kann nicht mehr abgelesen werden
- => **Annahme: keine Expression von β 2-m in mutanten Mäusen**

Ergebnisse der Transkription

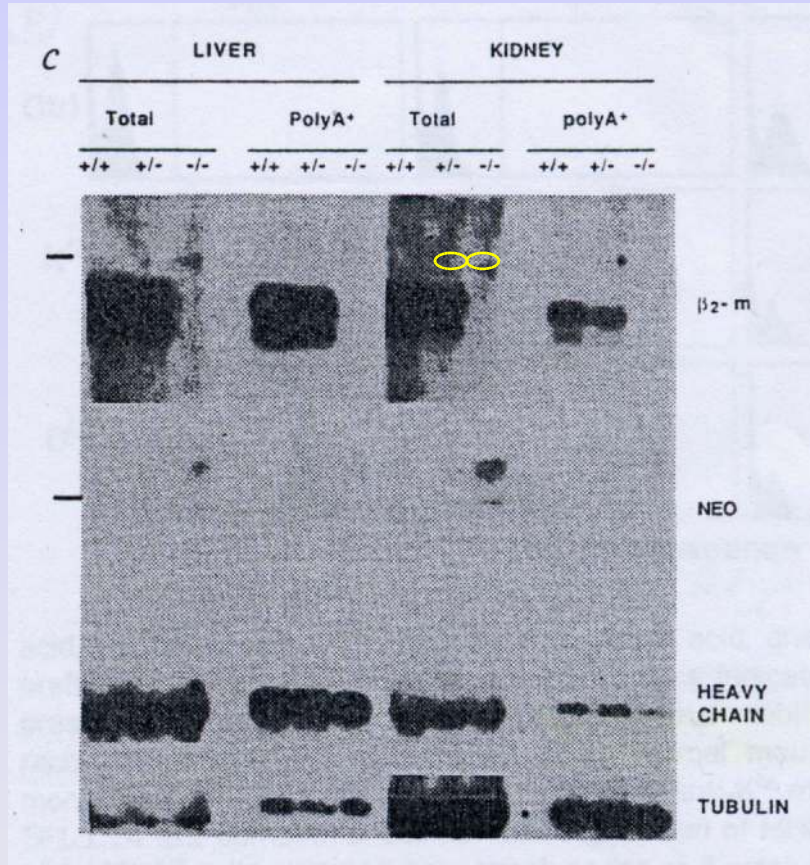
- Bei der Transkription des wt- Gens erhält man 2 unterschiedliche mRNAs:
 - bei **0,8 kb** und bei **1kb**, dies ist auf unterschiedliche Polyadenylierungssignale zurückzuführen
- Beim mutanten Gen entstehen vier Transkripte:
 - die **1,4kb** und **1,6kb** sind auf die Tätigkeit des tk-Promotors zurückzuführen, die **1,9kb** und **2,1 kb** Transkripte entstehen zwar durch den selben Promotor wie die wt-Transkripte(β 2-m), sind jedoch länger aufgrund der Insertion des neo-Gens

Expression von β 2-Microglobulin



- Northern Blot Analyse von zellulärer RNA
- RNA-Proben aus embryonalen primären Fibroblasten
- **β₂-m Probe:**
2,0kb Bande schwächer als 1,0 bzw 0,8kb
=> weniger RNA entstanden als beim wt Gen
- **Neo-Probe:** Kontrolle für die Insertion
- Schwere Kette als Nachweis für die Membrangebundenheit
- **Interferon:** Cytokiner Wachstumsfaktor; stimuliert die Proteinbildung von MHC I
=> Ohne Interferon keine Banden mit der **Heavy Chain Probe** sichtbar
- **Tubulin** als Ladungskontrolle

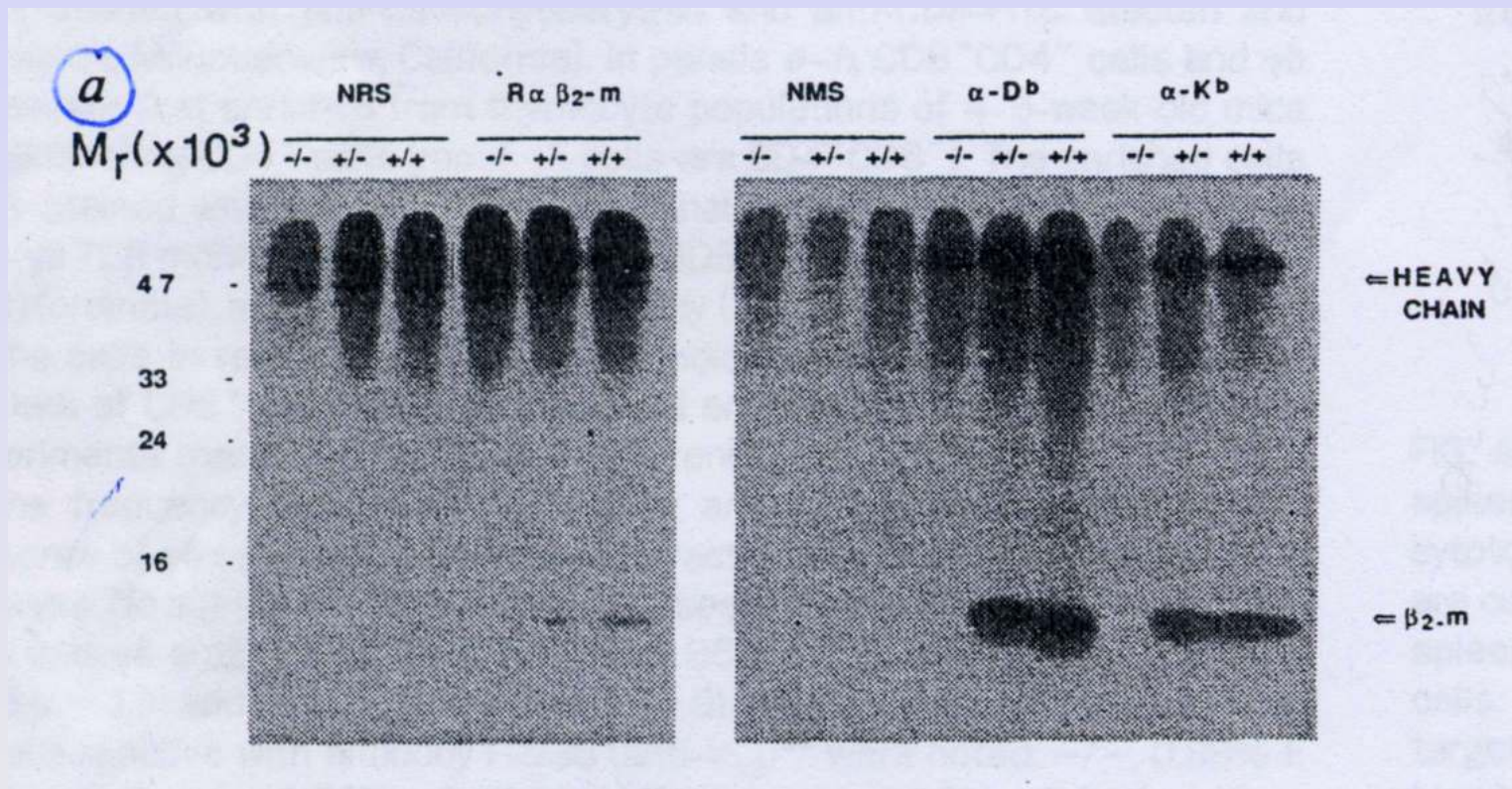
Expression von β 2-Microglobulin



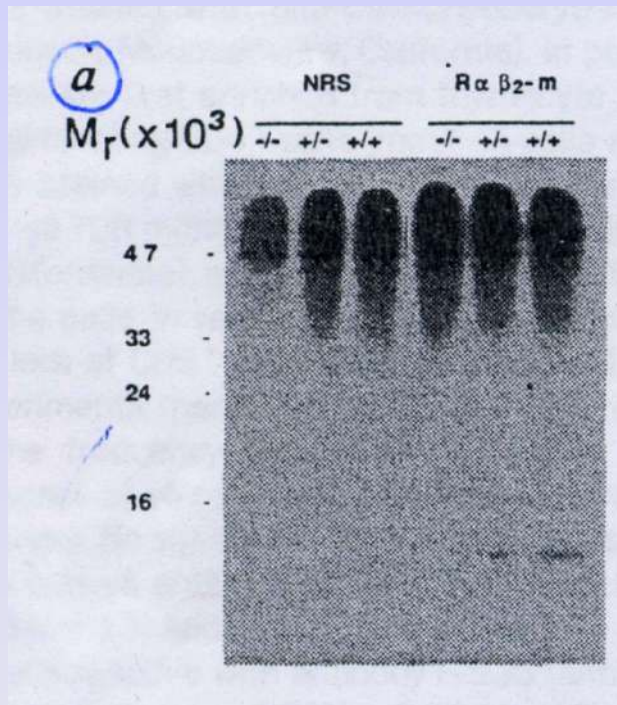
- Northern Blot zelluläre RNA und poly-A RNA, adult
- Proben aus Leber und Niere
- Ähnliche Banden wie bei embryonalen Banden=> zusätzliche schwache Bande bei 1,5 kb sichtbar=> könnte RNA sein, die vom tk-Promotor initiiert wurde=> Transkript vom tk-Promotor scheint geringer als bei wt Mäusen (β 2-prom), Vermutung: tk-Promotor hat inhibierenden Effekt auf β 2-m Promotor oder zusätzliche Mutationen vorhanden
- Bei den Homozygoten Poly-A Transkripten entstehen keine Banden bei 1,5kb => kein Polyadenylierungssignal (diese nur bei Transkript vom β 2-m Promotor vorhanden)
- Die Stabilität und Transkription der MHC I schweren Kette scheint nicht beeinflusst

Immunpräzipitation

- Embryonale Fibroblasten wurden mit Interferon behandelt und mit radioaktiven ^{35}S -Methionin markiert
=> Proteinextrakte
- Anschließend Immunpräzipitation mit Anti $\beta_2\text{-m}$ und zahlreichen MHC I Antikörpern



Immunpräzipitation



- NRS: Normal Rabbit Serum

=> Kontrolle

- R α β_2 -m: Antikörper aus Hasenserum

- => Wildtyp und Heterozygote Mäuse:
schwache Bande bei 12kb (Expression
von β_2 -m)

Homozygote Mäuse => keine Bande

- Keine Expression von β_2 -m in
homozygot mutanten Mäusen möglich
(Antikörper kann nicht gebunden
werden)

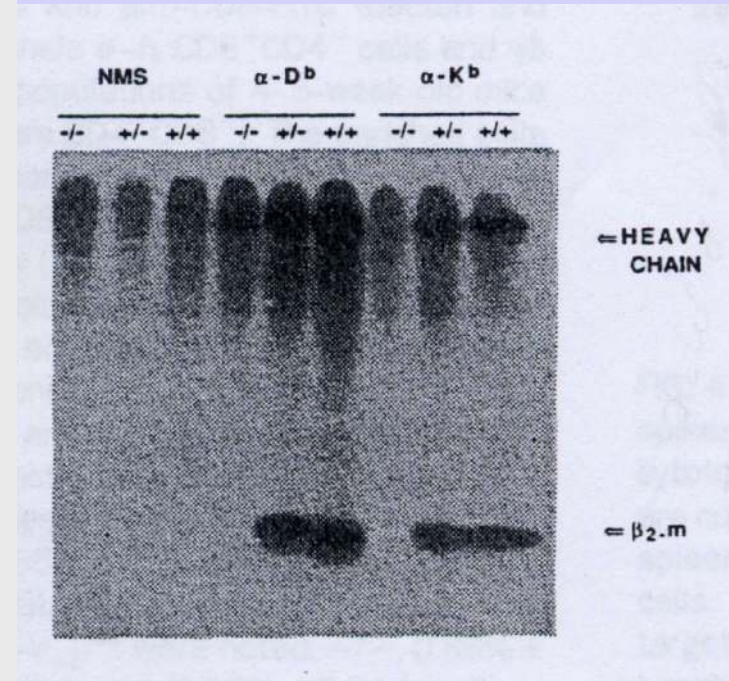
Immunopräzipitation

- Normal Mouse Serum, Anti-Db Monoklonaler Antikörper und Anti Kb Monoklonaler Antikörper

- (K^b , D^b und weitere sind unterschiedliche Allele des MHC Klasse I Gens)

- Die Erkennung der H-2 K^b Schwere Kette durch einen monoklonalen Antikörper bedarf offenbar einer Assoziation mit β_2 -m, da diese Bande (46K) bei den Homozygoten mutanten Mäusen nicht erkennbar ist

- Anders bei der H-2 D^b Schwere Kette, diese kann wohl auch bei (-/-) Mäusen erkannt werden (44K) => Zumindest geringe Prozessierung des H2- D^b Polypeptids in Abwesenheit von β_2 -m



Kann MHC I an der Oberfläche exprimiert werden?

Vorangegangenes Experiment hat bewiesen das geringe Mengen von MHC Klasse I exprimiert werden können

Allerdings kann man bei der Immunopräzipitation nicht zwischen endo und exogenem β 2-m unterscheiden => Zellen sind zum Zeitpunkt der Präzipitation schon zerstört

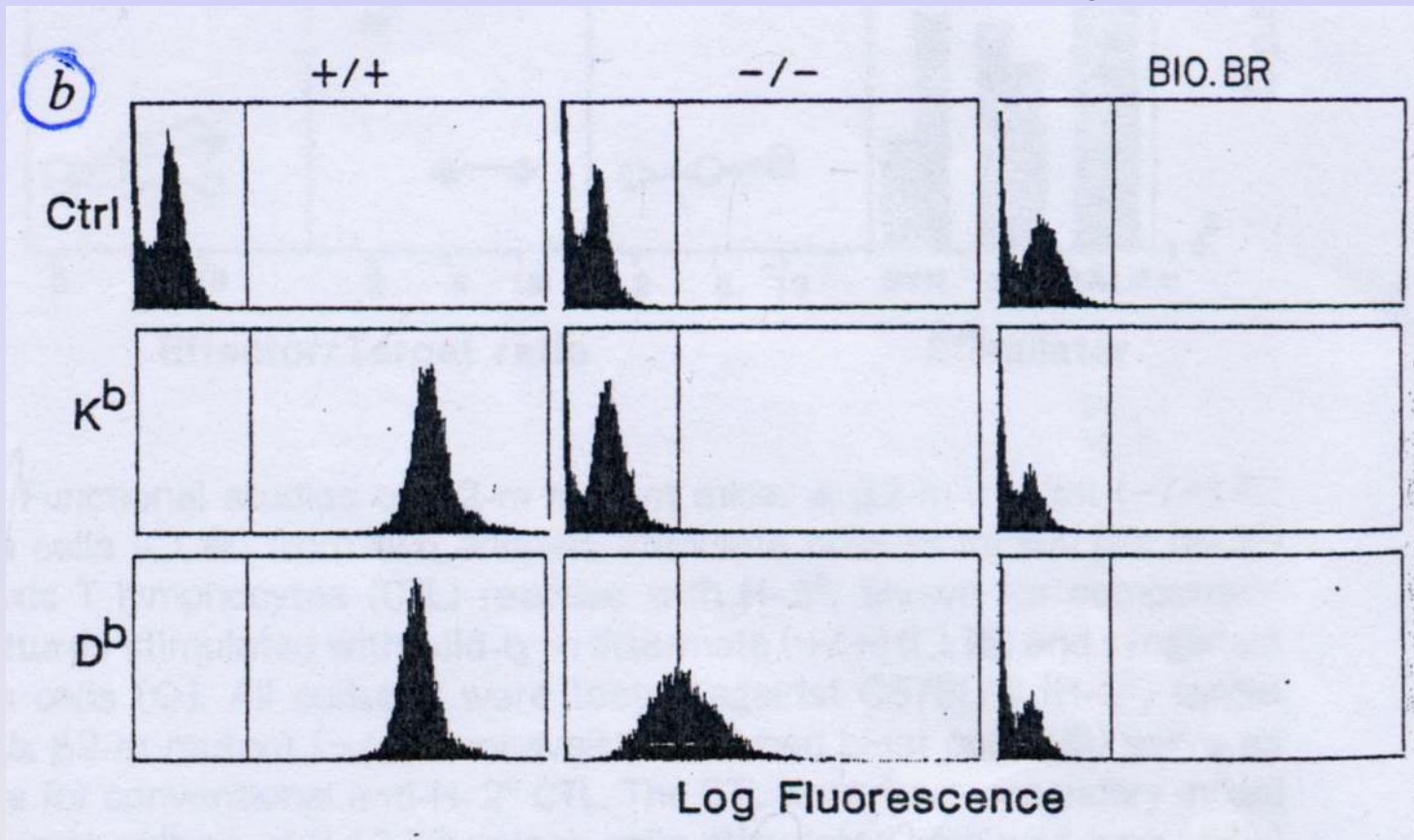
Methode erforderlich die nur Oberflächen der Zellen beachtet

⇒ **FACS Assay** (Zellen werden vorher nicht lysiert, sind noch intakt)

⇒ Oberflächendetektion möglich

FACS-Analyse

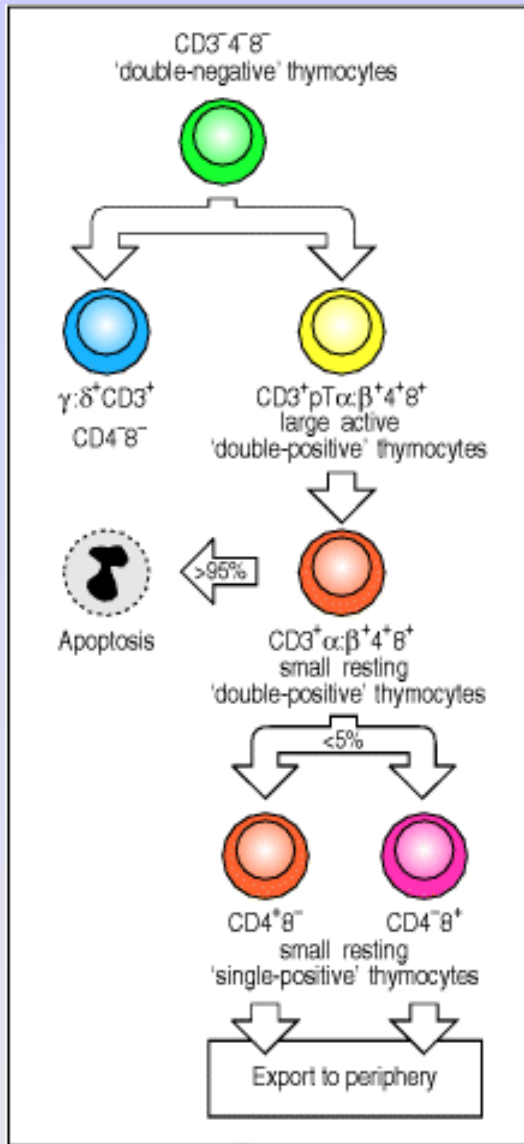
Negativkontrolle



Ergebnisse des FACS

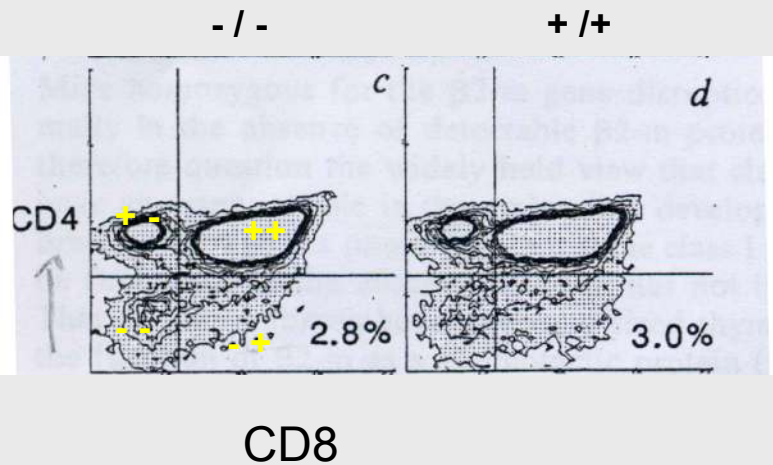
- Deutlicher Shift(Nachweis von MHC I) erkennbar bei wt- Mäusen (beide Allele)
- Bei den mutanten Mäusen ist beim H-2Kd Allel kein Shift zu erkennen
=> wie vorher vermutet gibt es hier tatsächlich keine Expression von MHC Klasse I auf der Oberfläche
- Beim Db Allel ist ein leichter Shift zu erkennen
=> es wurden Zellen detektiert die MHC auf der Oberfläche exprimieren (wenn auch in vielfach geringerer Konzentration als beim wt)
=> dieses Allel führt offenbar nur zu einem teilweisen Verlust der Expression des MHC Klasse I und die Expression von MHC auf der Oberfläche kann anscheinend auch ohne endogenes β 2-m stattfinden
- Die beiden Haplotypen verhalten sich unterschiedlich was die Bildung von MHC Klasse I betrifft

Unterscheidung von Thymocytenpopulationen verschiedener Reifungsstadien



Im Thymus

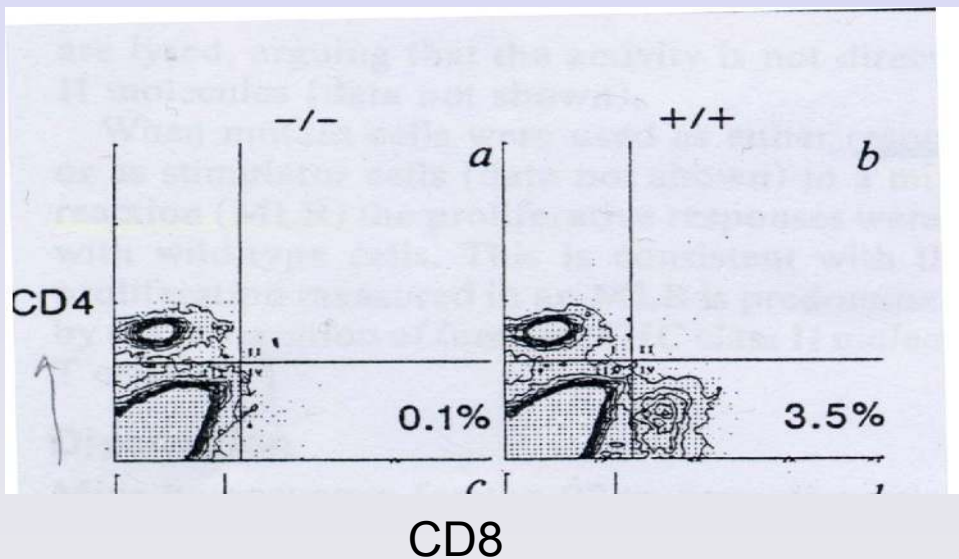
T-Zell Verteilung im Thymus



- Geringere Anzahl von CD4-8+ Zellen bei homozygot mutant gegenüber wildtyp
- Andere Zellen ziemlich konstant
=> Reifung der T-Zellen im Thymus
=> Ausdifferenzierung

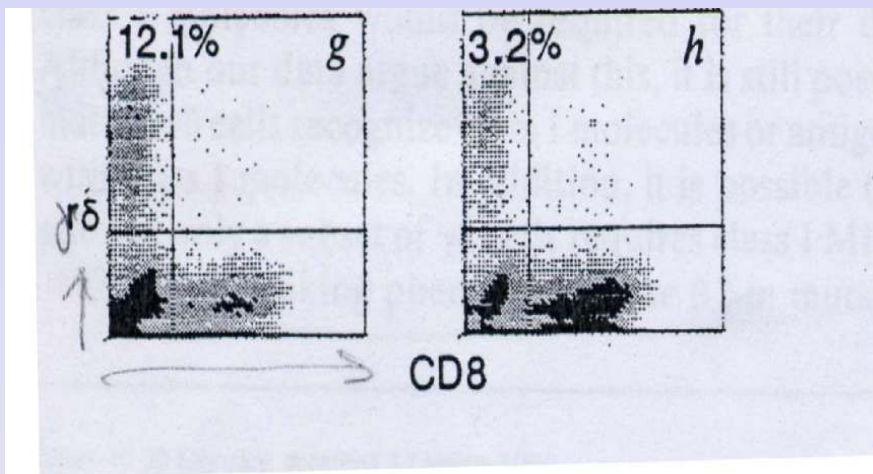
T-Zell Verteilung in der Milz

- Proben aus der Milz homozygot mutanter und wt- Mäuse
- Homozygote Mutante mit deutlich geringerer Zahl an cytotoxischen T-Zellen (CD8)
- T-Helferzellen (CD4) annähernd in gleicher Anzahl
=> β 2-m Knock-Out hat keinen Einfluss auf T-Helferzellen



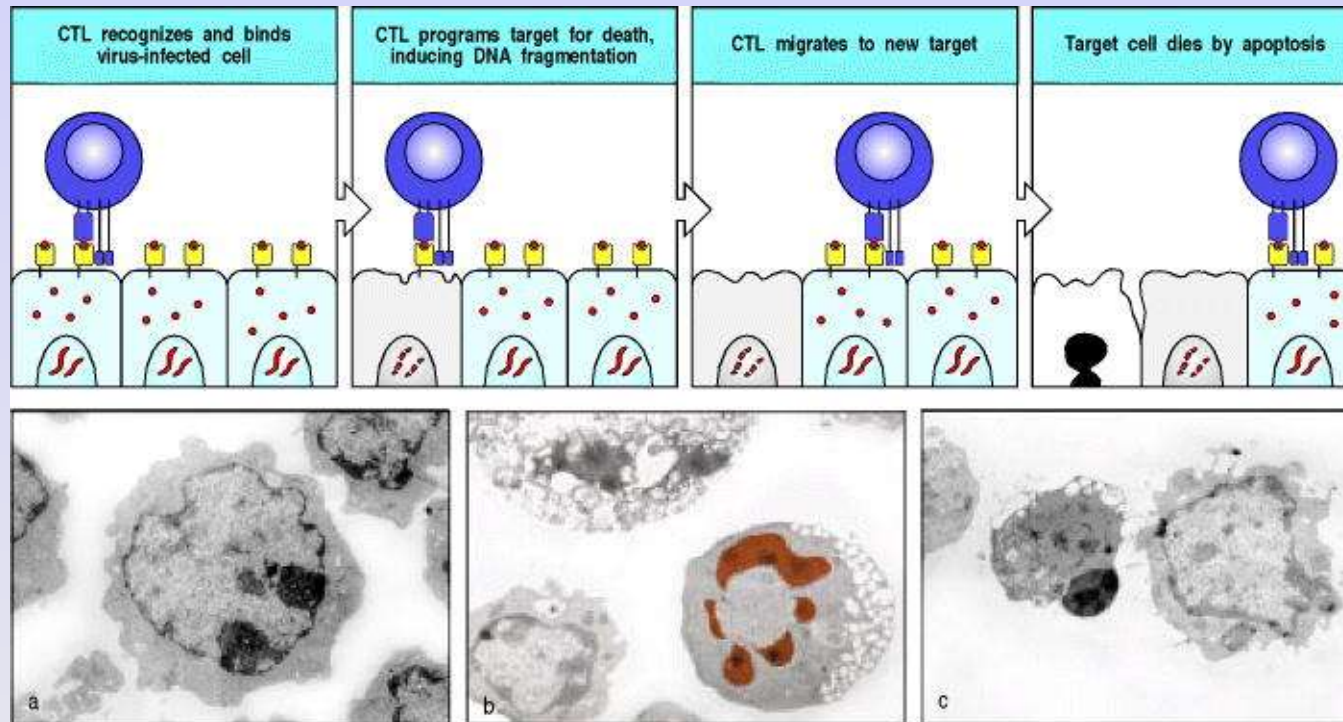
Wird die Expression von $\gamma\delta$ durch MHC Klasse I beeinflusst?

TCR: T-Zell Rezeptoren



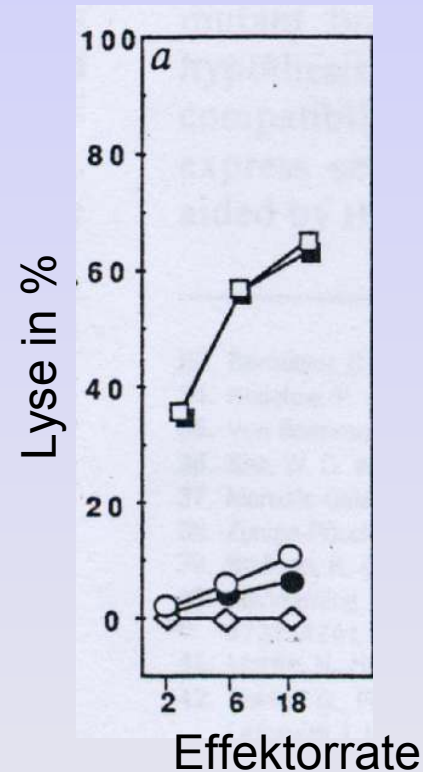
- Probe aus Thymus
- Die Funktion von TCR $\gamma\delta^+$ ist nicht gut erforscht
- Ergebnisse -> sie werden nicht über MHC Klasse I selektiert
- Vermutung: Da bei homozygot mutanten Mäusen die cytotoxischen T-Zellen fehlen, können sich diese besser ausbreiten

Cytotoxische T-Zellen induzieren Apoptose

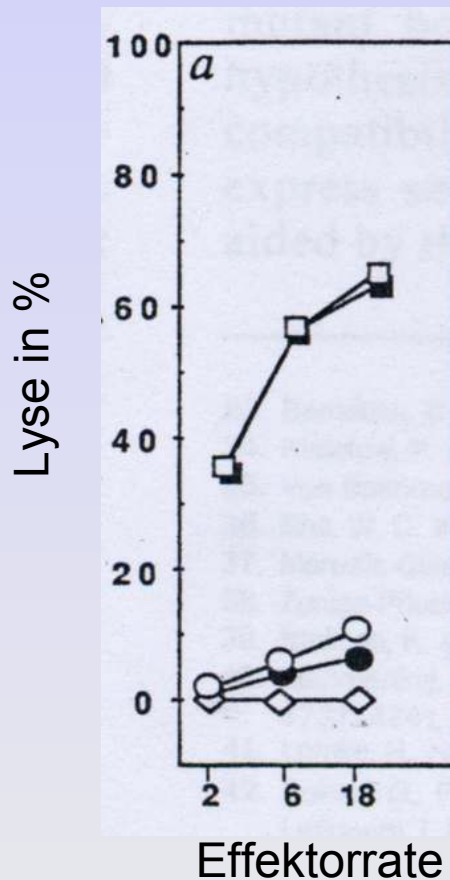


Allogener Kill Assay

- Zielzellen waren vom H-2b Genotyp
- Sinn dieses Assays ist zu sehen ob Mäuse mit dem H-2d lokus, BALB/ c (H-2d) machen und somit fähig sind cytotoxische Zellen zu bilden, die dann wiederum die H-2d präsentierten Zellen (Zielzellen) als fremd erkennen und deren Lyse induzieren
- β 2-m mutanten fehlt dieser Fremderkennungsmechanismus offensichtlich => sehr geringe Lyserate
- Der Nachweis erfolgt mittels radioaktiver Chrommarkierung und Messung



Haben $\beta 2$ -m mutante Zellen cytotoxische Aktivität?



- cytotoxische T-Zellen aus Stamm Balb H-2d
- Milzzellen aus Stamm 129 H-2b Haplotyp
- wt: -> effiziente Lyse
- Mutante: -> keine Lyse -> kann von cytotoxischen T-Zellen nicht mehr erkannt werden

Mutante Mäuse können keine cytotoxischen T-Zellen machen

- β 2-m negative Milzzellen haben keine signifikante CTL Antwort (cytotoxic T-Lymphozyt) hervorrufen können
 - > es kommt zu keiner Lyse
- Niedrige restliche H-2D^b Zelloberflächenexpression (durch FACS nachgewiesen) in homozygoten Mutanten ist nicht ausreichend, um eine hinreichende CTL Antwort auszulösen

Grundlegende Erkenntnisse

- **Mäuse die homozygot bezüglich des Knock-Outs für $\beta 2$ -Microglobulin sind produzieren kein $\beta 2$ -Microglobulin**
- **Sie produzieren kein (oder fast kein) MHC Klasse I Antigen auf der Zelloberfläche**
- **Sind aber fruchtbar und anscheinend gesund**
- **Sie zeigen eine normale Verteilung von $\gamma\delta$ $CD4^+$ 8^+ und $CD4^+$ 8^- T-Zellen**
- **Sie haben keine $CD4^-$ 8^+ T-Zellen und haben somit keine cytotoxische Aktivität**
- **Annahme: MHC Klasse I Moleküle sind äußerst wichtig für die positive Selektion von $CD4^+$ 8^- T-Zellen im Thymus**